

## 論文審査の要旨及び担当者

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	松下 美紗子
論文審査担当者 主 査 内科学 金 井 隆 典 生理学 岡 野 栄 之 分子生物学 塩 見 春 彦 解剖学 仲 嶋 一 範 学力確認担当者： 審査委員長：岡野 栄之 試問日：平成30年 1月31日				
(論文審査の要旨)				
論文題名：Neural differentiation of human embryonic stem cells induced by the transgene-mediated overexpression of single transcription factors (遺伝子導入を用いた単一転写因子の強制発現系によるヒト胚性幹細胞の神経様分化)				
<p>本研究では、転写因子Neurogenin1 (NEUROG1)、NEUROG2、NEUROG3、Neuronal Differentiation1 (NEUROD1) およびNEUROD2の過剰発現が、ヒト胚性幹細胞に及ぼす影響について検討した。これらの過剰発現では、いずれもNeuronal nuclei (NeuN) 等の成熟神経マーカーが、免疫染色にて検出できた。またOligodendrocyte transcription factor 2 (OLIG2) 等のサブタイプマーカーも、細胞群の一部で発現を認めた。加えて、カルシウムイメージング法やパッチクランプ法で電気生理学的な特徴を検討したところ、神経細胞としての活動性を有し、電位依存性ナトリウムチャネルの阻害剤であるテトロドトキシンに対する感受性を認めた。以上の結果から、これらの転写因子のヒト胚性幹細胞における過剰発現により、神経細胞を分化誘導できることが示された。</p> <p>審査では、個々の転写因子の発現量の差異について質問された。十分な発現を定量PCRで確認したこと、発現量は株間で均一ではないことが回答された。また本研究では神経培地ではなく多能性幹細胞培地を用いており、細胞の生存性について問われた。3週間程度の培養中に細胞の剥離を認め、本条件は分化した細胞に最適ではないと考えられること、成熟神経細胞用の培地で解決する可能性があるが、具体的条件は決定できなかったことや、目的外の細胞を薬剤で排除しうることが回答された。考察中で培地により神経細胞のサブタイプをコントロールできる可能性につき言及しており、その根拠を問われた。本論文内では培地の検討をしていないが、マウス胚性幹細胞にNeurog1を導入する際、成長因子の濃度勾配により形質を制御できる可能性が報告されている (Velkey et al. Developmental Dynamics. 2013) と回答された。また、敢えて神経細胞が生存しにくい幹細胞培地を用いた意義について問われた。分化に影響を与える成長因子等の影響を排除して単一因子の分化誘導能について評価することを優先したことが回答された。カルシウムイメージング法およびパッチクランプ法で得られた結果から、神経細胞様のチャネルの発現を確認できたかどうか質問された。電流電圧曲線は作成しておらずチャネルの特性は検討できていないこと、テトロドトキシンに対する感受性から電位依存性ナトリウムチャネルの存在は推定できること、テトロドトキシンのwashout実験が望ましいが、技術的に困難であったとを回答された。</p> <p>以上、本研究には検討すべき課題を残すものの、NEUROG1、NEUROG2、NEUROG3、NEUROD1およびNEUROD2が神経分化に果たす役割を示す上で有意義な研究であると評価された。</p>				